

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 36 875.9

Anmeldetag: 05. August 1999

Anmelder/Inhaber: VERMICON engineering & microbiology
Aktiengesellschaft, München/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweisen von Mikroorganismen
in einer Probe

Priorität: 07.05.1999 DE 199 21 281.3

IPC: C 12 Q, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Weilmayr

08.08.99

MAIWALD GMBH
PATENTANWÄLTE

München • Hamburg

Patentanwälte

Dr. Walter Maiwald (München)
Dr. Volker Hamm (Hamburg)
Dr. Stefan Michalski (München)
Dr. Regina Fischer (München)

Rechtsanwalt
Stephan N. Schneller (München)

In Kooperation mit:
Dr. Schmidt-Felzmann & Koziarka
Rechtsanwälte
(Hamburg)

Parr • Tauche • Jaeger •
Leutheusser - Schnarrenberger
Rechtsanwälte
(München • Starnberg)

München,
5. August 1999

Aktenzeichen
Neuanmeldung
VERMICON AG

Unser Zeichen
V 7231 / RF

VERMICON engineering & microbiology Aktiengesellschaft
Nymphenburger Straße 81, D-80636 München

Verfahren zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe

Die Identifizierung von Mikroorganismen konnte viele Jahrzehnte nur nach vorhergehender Kultivierung der Mikroorganismen und damit einhergehender Amplifizierung erfolgen. Diese Kultivierung erfolgt z.B. für Viren auf ihrem jeweiligen Wirtsorganismus, für Bakterien, Pilze und einzellige Algen in Nährmedien. Für die Erfassung der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen in einer bestimmten Probe wurden Medien bzw. Bedingungen gewählt, welche eine selektive Erfassung bestimmter Gruppen weitgehend ausschließen sollten. So wurden z.B. von

RF:rp

POSTFACH 330523 • 80065 MÜNCHEN
EISENHOF • ELISENSTRASSE 3 • 80335 MÜNCHEN
TELEFON +49 (0)89-747 266-0 • FAX +49 (0)89-776 424
Email: info@maiwald-partner.com

Geschäftsführer: Dr. Walter Maiwald • Dr. Volker Hamm • Dr. Stefan Michalski • Dr. Regina Fischer

bakteriellen Einzelkolonien Reinkulturen angelegt und diese aufgrund phänotypischer Merkmale, z.B. ihrer Morphologie und Stoffwechselwege, identifiziert. Die Identifizierung von Mikroorganismen nach vorheriger Kultivierung ist jedoch mit zwei entscheidenden Nachteilen verbunden. Erstens belegen Untersuchungen an den verschiedensten Umweltproben, daß nur 0,1 bis 14 % aller Bakterien z.Z. kultivierbar sind. Zweitens konnte bewiesen werden, daß bei der Kultivierung starke Populationsverschiebungen auftreten können, d.h. bestimmte Bakteriengruppen im Labor bevorzugt bzw. andere diskriminiert werden.

Dies bedeutet nicht nur, daß ein Großteil der Bakterien in Umweltproben nicht erkannt werden kann, sondern auch, daß diejenigen Bakterien, welche identifiziert werden, meist ein verzerrtes Abbild der wahren Populationsstrukturen darstellen. Fehleinschätzungen der Populationsverhältnisse in bezug auf Identifizierung und Quantifizierung der Bakterien sind die Folge.

Anfang der neunziger Jahre wurde ein Verfahren zur in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden entwickelt, das in vielen Umweltproben erfolgreich zum Einsatz kam (Amann et al. (1990) J. Bacteriol. 172:762). Dieses "FISH" genannte (fluoreszierende in situ-Hybridisierung) Verfahren beruht auf der Tatsache, daß die in jeder Zelle vorhandenen ribosomalen RNAs (rRNAs) hochkonservierte, d.h. wenig spezifische, und weniger konservierte, d.h. gattungs- und artspezifische Sequenzen umfaßt. Schon Mitte der achtziger Jahre wurde gezeigt, daß die Sequenzen der 16S- und 23S-rRNA zur Identifizierung von Mikroorganismen genutzt werden können (Woese (1987) Microbiol. Reviews 51:221; De Long et al. (1989) Science 243:1360). Bei dem FISH-Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Sonden, deren Sequenzen zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Sondenmoleküle sind in der Regel 16 bis 20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und sind einem Zielbereich komplementär, der für eine bestimmte Bakterienart oder eine bakterielle Gattung spezifisch ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Sonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß durch die in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden bis zu 90% einer Bakteriengesamtpopulation detektiert werden können. Das Verfahren

stellt daher bereits eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik dar, der die Detektion von maximal 14% der Bakterienpopulation einer Umweltprobe möglich machte. Darüber hinaus erlaubt es das Verfahren der in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden, den aktiven Anteil einer Population zu bestimmen, indem das Verhältnis einer gegen alle Bakterien gerichteten Sonde und dem Trockengewicht bestimmt wird. Schließlich erlaubt das Verfahren, Bakterien direkt am Ort ihres Wirkens sichtbar zu machen, wodurch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bakterienpopulation erkannt und analysiert werden können.

Innerhalb der letzten Jahre wurde die Technik der in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden für die verschiedensten Umweltproben ausgetestet und erfolgreich angewandt. So konnten durch den Einsatz von Gensonden im Boden, in Protozoen, in Biofilmen, in der Luft, in Seen, in biologisch aktivierten Filtern und im Abwasser von Kläranlagen die jeweiligen Bakterienpopulationen untersucht und neuartige Bakterien identifiziert werden. Der Schwerpunkt lag hierbei in der Analyse der Bakterienpopulationen bei der Abwasserreinigung. Tropfkörper-, Raumfiltrations- und Belebtschlammanlagen wurden ebenso untersucht wie die Nachklärbecken und entsprechenden Vorfluter (Snaird et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:2884). Durch die in situ-Hybridisierungstechnik konnte gezeigt werden, daß es bei der Erfassung der Belebtschlammflora durch Kultivierung zu einem Kultivierungsshift kommt (Wagner et al. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59:1520). Kultivierungsabhängige Verfahren liefern daher nur einen sehr verfälschten Einblick in die Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiellen Biozönose. Durch diese Medium-abhängige Verzerrung der realen Verhältnisse innerhalb der Bakterienpopulation werden Bakterien, die im Belebtschlamm eine untergeordnete Rolle spielen, aber den eingesetzten Kultivierungsbedingungen gut angepaßt sind, in ihrer Bedeutung dramatisch überschätzt. So konnte gezeigt werden, daß aufgrund eines solchen Kultivierungsartefakts die Bakteriengattung *Acinetobacter* bezüglich ihrer Rolle als biologischer Phosphatentferner in der Abwasserreinigung völlig falsch eingeschätzt wurde.

Obwohl die in situ-Hybridisierung mit den neu entwickelten fluoreszenzmarkierten Gensonden eine rasche und genaue Analyse von Bakterienpopulationen im Abwasser möglich macht, konnte sie sich in der Praxis noch nicht durchsetzen. Gründe hierfür sind der hohe Anschaffungspreis für die benötigten technischen Geräte wie Fluoreszenzmikroskope, der Bedarf an qualifizierten

Kräften, welche für die Durchführung und Auswertung zur Verfügung stehen müssen, sowie die daraus resultierende geringe Anzahl möglicher Referenzmessungen. Weiterhin ist ein hoher Zeitaufwand für das Auszählen der detektierten Bakterienpopulationen (Quantifizierung) notwendig. Überdies erfordert das Auszählen hohe Erfahrungswerte, da zwischen echten (Sondenbindung hat tatsächlich stattgefunden) und falschen Signalen (Autofluoreszenz, keine Zellen) unterschieden werden muß.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem Mikroorganismen möglichst ohne vorherige Kultivierung nachgewiesen und gegebenenfalls quantifiziert werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in einer Probe mittels einer Nukleinsäuresonde gelöst, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Fixieren der in der Probe enthaltenen Mikroorganismen;
- b) Inkubieren der fixierten Mikroorganismen mit nachweisbaren Nukleinsäuresondenmolekülen, um eine Hybridisierung herbeizuführen;
- c) Entfernen nicht hybridisierter Nukleinsäuresondenmoleküle;
- d) Ablösen der hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle und
- e) Detektieren und gegebenenfalls Quantifizieren der abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter "Fixieren" von Mikroorganismen eine Behandlung verstanden werden, mit der die den jeweiligen Mikroorganismus umgebenden Hüllen so durchlässig gemacht werden sollen, daß die Nukleinsäuresonde mit der gegebenenfalls kovalent verbundenen Markierung durch die Hülle penetrieren kann, um so die Zielsequenzen im Zellinneren erreichen zu können. Bei der Hülle kann es sich z.B. um die ein Virus umgebende

Lipidhülle, um die Zellwand eines Bakteriums oder die Zellmembran eines einzelligen Mikroorganismus handeln. Zur Fixierung wird üblicherweise eine geringprozentige Paraformaldehydlösung verwendet. Sollte mit einer Paraformaldehydlösung im Einzelfall die einen Mikroorganismus umgebende Schutzhülle nicht penetrierbar gemacht werden können, so sind dem Fachmann ausreichend weitere Maßnahmen bekannt, die zu demselben Ergebnis führen. Dazu zählen beispielsweise Ethanol, Methanol, Mischungen dieser Alkohole mit Paraformaldehyd, enzymatische Behandlungen, Ultraschallbehandlung etc.

Bei einer Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 12 und 100 oder 15 und 50, besonders bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Die Nukleinsäuresonde ist so ausgewählt, daß es eine zu ihr komplementäre Sequenz im nachzuweisenden Mikroorganismus bzw. in der Gruppe nachzuweisender Mikroorganismen gibt. Komplementarität muß bei einer Sonde von nur ca. 15 Nukleotiden über 100 % der Sequenz gegeben sein, bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere Fehlpaarungsstellen erlaubt. Es muß jedoch gewährleistet sein, daß das Nukleinsäuresondenmolekül mit moderaten und/oder stringenten Hybridisierungsbedingungen tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z.B. 0 % Formamid in einem Hybridisierungspuffer wie er in Beispiel 1 beschrieben ist. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20 - 80 % Formamid in dem in Punkt 5.2 von Beispiel 1 beschriebenen Puffer.

Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 2 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44°C und 48°C, besonders bevorzugt 46°C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergentien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von der Sonden bzw. den Sonden, insbesondere deren Länge(n) und dem Grad der Komplementarität mit der Targetsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Der Fachmann ist mit hier einschlägigen Berechnungen vertraut.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens hat eine typische Hybridisierungslösung eine Salzkonzentration von 0,1 M bis 1,5 M, bevorzugt von 0,9 M, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfaßt der Hybridisierungspuffer üblicherweise ein Detergens, wie z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001-0,1%, bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%, und Tris/HCl in einem Konzentrationsbereich von 0,001-0,1 M, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,02 M. Der pH-Wert von Tris/HCl beträgt üblicherweise zwischen 6 und 10, wobei ein pH von ca. 8,0 bevorzugt ist. Wie oben erwähnt, kann die Hybridisierungslösung des weiteren zwischen 0% und 80% Formamid enthalten, je nachdem welcher Grad von Stringenz erwünscht ist bzw. benötigt wird.

Die Nukleinsäuresonde sollte im Hybridisierungspuffer wenn möglich in einer Menge von 15 ng bis 1000 ng anwesend sein, wobei diese Menge vorzugsweise in 80 µl Hybridisierungslösung enthalten ist. Besonders bevorzugt beträgt die Sondenkonzentration 125 ng/80 µl Hybridisierungslösung.

Nach erfolgter Hybridisierung sollten die nicht hybridisierten und überschüssigen Sondenmoleküle entfernt werden, was üblicherweise mittels einer herkömmlichen Waschlösung bzw. Waschpuffers erfolgt. Dieser Waschpuffer enthält gewöhnlicherweise 0,001-0,1% eines Detergens wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, und Tris/HCl in einer Konzentration von 0,001-0,1 M, bevorzugt 0,02 M, wobei der pH-Wert von Tris/HCl im Bereich von 6,0 bis 10,0, vorzugsweise bei 8,0, liegt. Weiter enthält der Waschpuffer üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz zwischen 0,003 M und 0,9 M, bevorzugt zwischen 0,01 M und 0,9 M, beträgt. Zusätzlich kann die Waschlösung EDTA enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 M beträgt.

Das „Abwaschen“ der nicht gebundene Sondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 44°C bis 52°C, bevorzugt zwischen 46°C und 50°C und besonders bevorzugt bei 48°C für eine Dauer von 10-40 Minuten, vorzugsweise für 20 Minuten.

Nach erfolgter in situ-Hybridisierung und anschließender Entfernung der nicht-hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle mittels des oben beschriebenen Waschschrittes erfolgt die

Abtrennung der hybridisierten Sondenmoleküle für die Detektion und, falls erwünscht, Quantifizierung der hybridisierten Sondenmoleküle. Für diesen Extraktionsschritt sind solche Extraktionsmittel geeignet, die bei einer geeigneten Temperatur eine Denaturierung der Sonde von der Targetsequenz gewährleisten ohne die Sondenmoleküle in nennenswertem Ausmaß zu beschädigen. Bevorzugt wird hierfür als Ablöselösung bzw. Ablösepuffer Wasser, also $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest./bidest.}}$ oder schwach gepuffertes Wasser, also bspw. Tris/HCl, im Konzentrationsbereich von 0,001 M bis 1,0 M, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01 M, verwendet, wobei der pH von Tris/HCl zwischen 7,0 und 11,0, vorzugsweise 9,0, beträgt. Weiter sind im Rahmen dieser Erfindung auch DMSO (Dimethylsulfoxid) und 1 x SSC, pH 10,0 (+/- 2,0) als Extraktionsmittel geeignet, wobei 1 x SSC geeigneterweise durch Verdünnung einer 20 x SSC-Stammlösung (175,2 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat, auffüllen mit Wasser auf 1 Liter) zubereitet wird.

Die Ablösung der Sondenmoleküle erfolgt üblicherweise für eine Dauer von 5 bis 30 Minuten, bevorzugt für 15 Minuten. Dabei erfolgt die Sondenextraktion in einem Temperaturbereich von 50-100°C, vorzugsweise bei etwa 80°C. In jedem Fall sollte versucht werden, die Extraktion bei einer Temperatur durchzuführen, die eine effektive aber gleichzeitig für die Sondenmoleküle schonende Abtrennung gewährleistet. Da die Sonden durch die Extraktionsbehandlung umso weniger beeinträchtigt werden, je geringer die Temperatur, wird eine Temperatur < 100°C, insbesondere < 90°C bevorzugt.

In einem Vergleichsversuch wurden $4,8 \times 10^6$ *Burkholderia cepacia*-Zellen mit zwei fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (jeweils 2,5 µl BET42a-Cy3 bzw. NonEUB338-Cy3) mittels des erfindungsgemäßen Fast-FISH-Verfahrens hybridisiert. Die Sondenextraktion erfolgte 15 Minuten bei 80°C mit 110 µl Ablöselösung, wobei $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, 0,01 M Tris/HCl, pH 9,0, 1 x SSC, pH 10,0, DMSO und Formamid hinsichtlich des Meßsignals, also der Fluoreszenzintensität miteinander verglichen wurden. Während sowohl mit Wasser, 0,01 M Tris/HCl, 1 x SSC und DMSO gute bis sehr gute Ergebnisse erzielt werden konnte, konnte unter Verwendung von Formamid kein, der Sondenextraktion mit den anderen Ablöselösungen vergleichbares Meßsignal erzielt werden. Vielmehr war das mit Formamid als Extraktionslösung erreichbare Signal um mindestens Faktor 10 geringer als die Intensitäten, die bspw. mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ oder 0,01 M Tris/HCl

gemessen werden konnten. Bei einer Ablösetemperatur von 100°C (also einer Temperatur des Extraktionsmittels von 100°C) war der Unterschied in den Meßsignalen zwischen Formamid einerseits und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bzw. 0,01 M Tris/HCl andererseits noch stärker ausgeprägt. Diese Beobachtungen sind höchstwahrscheinlich auf eine noch stärkere Beeinträchtigung der Sondenmoleküle durch Formamid mit zunehmender Temperatur zurückzuführen.

Aufgrund dieser Beobachtungen werden insbesondere $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder 0,01 M Tris/HCl als Extraktionsmittel gegenüber Formamid, das im Stand der Technik in der Regel als Extraktionsmittel empfohlen wird, bevorzugt. Durch den Verzicht von Formamid im Extraktionsschritt erzielt man nicht nur eine schonendere Behandlung, es ergeben sich zusätzlich auch Vorteile hinsichtlich des Gefahrenpotentials, da es sich bei Formamid um eine Substanz der Giftklasse 3 handelt. Darüber hinaus ist die Verwendung von Formamid im Vergleich zu Wasser oder schwach gepuffertem Wasser wesentlich kostenintensiver.

Die Auswahl der jeweiligen Nukleinsäuresonde erfolgt in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Mikroorganismus: Sollen beispielsweise nur Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus salivarius* nachgewiesen werden, nicht jedoch Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus thermophilus*, so wird der Fachmann eine geeignete Sequenz auswählen, die in *Streptococcus salivarius* auftritt, in *Streptococcus thermophilus* dagegen nicht. Typischerweise werden diese Sequenzen aus der 16S- oder 23S-rRNA ausgewählt. Ist dagegen erwünscht, alle Bakterien der Gattung *Streptococcus* zu erfassen, wird eine Sequenz ausgewählt werden, die *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus thermophilus* sowie weiteren Spezies der Gattung *Streptococcus* gemeinsam ist. Für solche Sequenzen sind in der Literatur bereits viele Beispiele veröffentlicht, siehe z.B. Beimfohr et al. (1993) System Appl. Microbiol. 16:450. Die Nukleinsäuresonde kann dabei komplementär zu einer chromosomalen oder episomalen DNA sein, aber auch zu einer mRNA oder rRNA des nachzuweisenden Mikroorganismus. Dabei ist es bevorzugt, Nukleinsäuresonden zu wählen, die einem Bereich komplementär sind, der in einer Kopienzahl von mehr als 1 im jeweiligen nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Die nachzuweisende Sequenz liegt bevorzugt 500 - 100.000 mal pro Zelle vor, besonders bevorzugt 1000 - 50.000 mal. Dies ist ein weiterer Grund, warum die Nukleinsäuresonde besonders bevorzugt komplementär zu einer

rRNA ist: die ribosomalen RNAs sind Bestandteile der Ribosomen, die, da sie die Proteinsynthesemoleküle darstellen, in jeder aktiven Zelle vieltausendfach vorhanden sind.

Erfindungsgemäß wird die Nukleinsäuresonde mit dem im obengenannten Sinne fixierten Mikroorganismus inkubiert, um so ein Eindringen der Nukleinsäuresondenmoleküle in den Mikroorganismus und die Hybridisierung von Nukleinsäuresondenmolekülen mit den Nukleinsäuren des Mikroorganismus zu erlauben. Daran anschließend werden nicht hybridisierte Nukleinsäuresondenmoleküle durch übliche Waschschrte entfernt. Im Gegensatz zum herkömmlichen FISH-Verfahren werden nunmehr jedoch nicht die hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle in situ, also im jeweiligen Mikroorganismus, belassen, sondern von der nachzuweisenden Nukleinsäure wiederum abgelöst und von zellulären Bestandteilen getrennt, detektiert und gegebenenfalls quantifiziert. Voraussetzung dafür ist, daß das erfindungsgemäß verwendete Nukleinsäuresondenmolekül nachweisbar ist. Diese Nachweisbarkeit kann z.B. durch kovalente Verbindung des Nukleinsäuresondenmoleküls mit einem detektierbaren Marker sichergestellt werden. Als detektierbare Marker werden üblicherweise fluoreszierende Gruppen, z.B. Cy-2, Cy-3 oder Cy-5, FITC, CT, TRITC oder Fluos-Prime verwendet, die dem Fachmann alle wohlbekannt sind; der Vollständigkeit halber sind einige Marker, ihre Eigenschaften und Bezugsquellen in der folgenden Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1

FLUOS:	5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidedester (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland); $\varepsilon = 7,50 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 494 nm; Em_{max} bei 518nm, MG = 473.
TRITC:	Tetramethylrhodamin-5,6 isothiocyanat (Isomer G. Molecular Probes Inc., Eugene, USA, Lambda, Graz, AT); $\varepsilon = 1,07 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 537 nm; Em_{max} bei 566 nm, MG = 479.

CT: 5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester (Molecular Probes Inc., Eugene, USA); $\epsilon = 0,87 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 537 nm; Em_{max} bei 566 nm.

CY-3: NHS-Ester von Cy5.18 (Biological Detection Systems, Pittsburgh, USA); (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA); $\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 532 nm; Em_{max} bei 565 nm. MG = 765,95.

CY-5: NHS-Ester von Cy5.18 (Biological Detection Systems, Pittsburgh, USA); (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA); $\epsilon = > 2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 650 nm; Em_{max} bei 667 nm. MG = 791,99.

Bei Verwendung von fluoreszierenden Markern wird das erfindungsgemäße Verfahren in Anlehnung an das oben erwähnte „FISH“-Verfahren im folgenden auch als „Fast-FISH“-Verfahren bezeichnet.

Alternativ werden chemolumineszierende Gruppen oder radioaktive Markierungen, z.B. ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}J , verwendet. Nachweisbarkeit kann aber auch gegeben sein durch Kopplung des Nukleinsäuresondenmoleküls mit einem enzymatisch aktiven Molekül, beispielsweise alkalischer Phosphatase, saurer Phosphatase, Peroxidase, Meerrettichperoxidase, β -D-Galaktosidase oder Glukoseoxidase. Für jedes dieser Enzyme ist eine Reihe von Chromogenen bekannt, die anstelle des natürlichen Substrats umgesetzt werden können, und entweder zu farbigen oder zu fluoreszierenden Produkten umgesetzt werden können. Beispiele für solche Chromogene sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2

Enzyme

Chromogen

1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase

4-Methylumbelliferylphosphat (*),
Bis(4-Methylumbelliferylphosphat), (*) 3-O-Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphatdiammoniumsalz (*),
p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz

2. Peroxidase

Tyraminhydrochlorid (*), 3-(p-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (*), p-Hydroxyphenethylalkohol (*),
2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenylendiamindihydrochlorid,
o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Ucresol (*),
3,3'-dimethyloxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon, Tetramethylbenzidin

3. Meerrettichperoxidase

H_2O_2 + Diammoniumbenzidin
 H_2O_2 + Tetramethylbenzidin

4. β -D-Galaktosidase

o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid,
4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktosid

5. Glukoseoxidase

ABTS, Glukose und Thiazolylblau

* Fluoreszenz

Schließlich ist es möglich, die Nukleinsäuresondenmoleküle so zu gestalten, daß an ihrem 5'- oder 3'-Ende eine weitere zur Hybridisierung geeignete Nukleinsäuresequenz vorhanden ist. Diese Nukleinsäuresequenz umfaßt wiederum ca. 15 bis 1000, bevorzugt 15 bis 50 Nukleotide. Dieser zweite Nukleinsäurebereich kann wiederum von Oligonukleotidsonden erkannt werden, die durch eines der obenerwähnten Mittel nachweisbar sind.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der nachweisbaren Nukleinsäuresondenmoleküle mit einem Hapten. Nach Ablösung der Nukleinsäuresondenmoleküle von der Zielnukleinsäure können die nunmehr separat vorliegenden Nukleinsäuresondenmoleküle mit das Hapten erkennenden nachweisbaren Antikörpern in Kontakt gebracht werden. Ein bekanntes Beispiel für ein solches Hapten ist Digoxigenin oder seine Derivate. Dem Fachmann sind über die angegebenen Beispiele hinaus viele weitere Möglichkeiten bekannt, ein zur Hybridisierung verwendetes Oligonukleotid zu detektieren und zu quantifizieren.

Die Vielzahl möglicher Markierungen ermöglicht auch den gleichzeitigen Nachweis von zwei oder mehr verschiedenen, sich überlappenden oder sich nicht überlappenden Populationen. So kann z.B. durch Verwendung von 2 verschiedenen Fluoreszenzmarkern *Streptococcus salivarius* neben *Streptococcus thermophilus*, oder *Streptococcus salivarius* neben der Streptococcen-Gesamtpopulation nachgewiesen werden.

Der mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens nachzuweisende Mikroorganismus kann ein prokaryontischer oder eukaryontischer Mikroorganismus sein. In den meisten Fällen wird es erwünscht sein, einzellige Mikroorganismen nachzuweisen. Relevante Mikroorganismen sind dabei vor allem Hefen, Bakterien, Algen oder Pilze.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Mikroorganismus um einen Angehörigen der Gattung *Salmonella*.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vielfältig angewendet werden. So ist es z.B. geeignet, Umweltproben auf das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen zu untersuchen. Diese Umweltproben können aus dem Wasser, aus dem Boden oder aus der Luft entnommen sein. Für

den Nachweis von bestimmten Bakterien in Umweltproben ist normalerweise keinerlei vorausgehende Kultivierung notwendig.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Kontrolle von Lebensmittelproben. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Lebensmittelproben aus Milch oder Milchprodukten (Joghurt, Quark, Käse, Butter, Buttermilch), Trinkwasser, Getränken (Säfte, Limonade, Bier), Backwaren oder Fleischwaren entnommen. Für den Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln kann u. U. eine vorherige Kultivierung erwünscht oder sogar vorgeschrieben sein. So ist es notwendig, z. B. für den Nachweis von einer einzigen Salmonelle in 25 ml Milch, diese eine zeitlang zu kultivieren, um anschließend auch mit statistischer Zuverlässigkeit eine oder mehrere Salmonellen im Probenvolumen zu haben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiter zur Untersuchung medizinischer Proben eingesetzt werden. Dabei ist es sowohl für die Untersuchung von Gewebeproben, z.B. Biopsiematerial aus der Lunge, Tumor- oder entzündlichem Gewebe, aus Sekreten wie Schweiß, Speichel, Sperma und Ausfluß aus der Nase, Harnröhre oder Vagina sowie für Stuhl- und Urinuntersuchungen geeignet.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für das vorliegende Verfahren ist die Untersuchung von Abwässern, z.B. Belebtschlamm, Faulschlamm oder anaerobem Schlamm. Darüber hinaus ist es geeignet, Biofilme in industriellen Anlagen zu analysieren, sowie auch sich natürlicherweise bildende Biofilme oder bei der Abwasserreinigung bildende Biofilme zu untersuchen. Schließlich ist es auch zur Untersuchung und Qualitätskontrolle pharmazeutischer und kosmetischer Produkte, z.B. von Salben, Cremes, Tinkturen, Säften etc. geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine Möglichkeit dar, die in situ-Hybridisierung zur Zellidentifizierung und gegebenenfalls Quantifizierung in der Praxis zu etablieren. Die erforderliche Ausstattung würde sich z.B. bei Verwendung von Fluoreszenzmolekülsonden auf den Erwerb eines Fluorometers beschränken (max. ca. DM 18000,--). Im Gegensatz dazu bewegt sich ein Epifluoreszenzmikroskop, das zur Durchführung des herkömmlichen FISH-Verfahrens geeignet ist, und mit welchem ausreichend gute in situ-Hybridisierungsergebnisse erzielt werden

können, in der Preisklasse von ca. DM 100000,--. Hinzu kommt, daß bei Verwendung z. B. von Cy-5 markierten Sonden, die Epifluoreszenzmikroskope zusätzlich mit einer hochwertigen CCD-Kamera ausgestattet sein müssen (Preis zwischen DM 30000,-- und DM 50000,--). Aus diesem Grund stellt das erfindungsgemäße Verfahren eine wesentlich billigere Meßmethode dar, als die zeitaufwendige Quantifizierung am Epifluoreszenzmikroskop. Überdies sind die laufenden Kosten des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Fluorometer wesentlich geringer als die des herkömmlichen Verfahrens mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Dies liegt vor allem daran, daß die Quecksilberhochdrucklampen (DM 450,-- pro Stück) der Epifluoreszenzmikroskope aus Qualitäts- und Sicherheitsgründen spätestens alle 100 Betriebsstunden erneuert werden müssen. Das enorm zeitaufwendige Zählen spezifisch markierter Zellen unter dem Mikroskop führt somit zu einem hohen Lampenverschleiß. Die Xenonbogenlampe eines Fluorometers (DM 3000,--) hat selbst bei intensiver Auslastung des Gerätes eine Haltbarkeit von 1 bis 3 Jahren. Einen zusätzlichen Kostenfaktor stellen auch die für die Messung benötigten Personalkosten dar. Während die quantitative Analyse einer Umweltprobe mittels des herkömmlichen Verfahrens vor allem beim Einsatz mehrerer Sonden mehrere Tage in Anspruch nimmt, sollte das erfindungsgemäße Verfahren diese Aufgabe innerhalb weniger Stunden erledigen. Für die Hybridisierung und Extraktion wird ein Zeitaufwand von 3 Stunden benötigt, die Quantifizierung im Fluorometer wird nur wenige Minuten in Anspruch nehmen. Die Quantifizierung könnte auch von ungeschulten Kräften vorgenommen werden, wohingegen bei dem herkömmlichen Verfahren die visuelle Quantifizierung die Fähigkeiten eines Spezialisten erfordert.

Obwohl die Erfindung im wesentlichen mit Bezug auf fluoreszenzmarkierte Sondenmoleküle beschrieben worden ist, versteht es sich von selbst, daß die genannten Vorteile bei Verwendung anderer Marker ebenfalls gegeben sind.

Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe bereitgestellt. Der Inhalt eines solchen Kits richtet sich im wesentlichen nach der Natur des nachzuweisenden Mikroorganismus. Er umfaßt als wichtigsten Bestandteil eine für den jeweils nachzuweisenden Mikroorganismus spezifische Nukleinsäuresonde sowie eine weitere Nukleinsäuresonde, mit der eine Negativkontrolle durchgeführt werden kann. Darüber hinaus umfaßt er einen Hybridisierungspuffer und gegebenenfalls einen

Lysepuffer. Die Wahl des Hybridisierungspuffers hängt in erster Linie von der Länge der verwendeten Nukleinsäuresonden ab. So müssen, wie dem Fachmann bekannt ist, für die Hybridisierung einer Nukleinsäuresonde von 15 Nukleotiden Länge weniger stringente Bedingung gewählt werden als für die Hybridisierung einer Sonde von 75 Nukleotiden Länge. Beispiele für Hybridisierungsbedingungen sind z. B. in Stahl & Amann (1991) in Stackebrandt u. Goodfellow (Hrsg.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, angegeben.

Die Zusammensetzung des Lysepuffers ist ebenfalls vom jeweiligen Mikroorganismus abhängig. So sind zur Lyse von Virushüllen, Zellwänden Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien, Zellmembranen von Hefe oder Algen jeweils leicht unterschiedliche Bedingungen erforderlich, die ohne weiteres in der Literatur festgestellt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Kit spezifische Sonden zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Nukleinsäuresondenmolekül zum spezifischen Nachweis eines Mikroorganismus um die Nukleinsäuresequenz

Salm63: 5'-TCGACTGACTTCAGCTCC-3'

und bei der Negativkontrolle um die Sequenz

NonSalm: 5'-GCTAACTACTTCTGGAGC-3'

oder um Nukleinsäuresondenmoleküle, die sich von Salm63 und/oder NonSalm durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden, wobei die Fähigkeit dieser Sonden, mit *Salmonella*-spezifischer Nukleinsäure zu hybridisieren, erhalten bleibt, oder um Nukleinsäuresondenmoleküle, die mit den zuvor genannten Nukleinsäuren hybridisieren können.

Die folgenden Abbildungen und die Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung und sollen nicht in einschränkender Weise ausgelegt werden.

Abbildungen

Abbildung 1 veranschaulicht, wie das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Zellen eines Typs A eingesetzt werden kann, während gleichzeitig die Anwesenheit von Zellen eines Typs B ausgeschlossen wird. Dazu werden Nukleinsäuresonden, die für die Zelltypen A und B spezifisch sind, bereitgestellt und mit der zu untersuchenden Probe hybridisiert. Während des Hybridisierungsvorganges dringen die verschiedenartig markierten Sonden A und B in die Zellen vom Typ A und C ein. Nur die Zelle vom Typ A enthält Zielnukleinsäure mit den Bindungsstellen für Sonden vom Typ A, nicht jedoch die Zelle C. Darüber hinaus besitzt keine der beiden Zellen Bindungsstellen für Sonden vom Typ B, der deshalb nicht gebunden wird. Nach dem anschließenden Waschschrift befinden sich nur noch gebundene Nukleinsäuresonden vom Typ A in den Zellen.

Die Mischung von Zellen, die zum Teil Nukleinsäuresondenmoleküle vom Typ A gebunden haben, wird einem Ablöseschritt unterworfen. Anschließend können die nun abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle vom Typ A quantifiziert werden.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer Hybridisierung von 10 in H-Milch inokulierten *S. typhimurium* LT2 Zellen nach 13stündiger Inkubation bei 37°C, 40 % im HP, HVL 400.

Ansatz mit Salmonellen:

Salm63-Cy3	erfaßt <i>Salmonella</i> spec., stellt spezifisches Signal dar
non15-Cy3	Nonsense-Sonde, repräsentiert unspezifische Bindung und Hintergrund
(Kontrolle 1)	

Ansatz ohne Salmonellen:

Salm63-Cy3 erfaßt *Salmonella* spec, repräsentiert den Hintergrund mit der Salmonellen-spezifischen Sonde, da in diesem Ansatz keine Salmonellen vorhanden waren (Kontrolle 2)

BEISPIEL 1

Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella* in Milch

1. Allgemeine Beschreibung:

Das nachfolgend beschriebene Verfahren, im Rahmen dieser Erfindung "SalmoQuick-Verfahren" genannt, dient zur qualitativen Analyse von Bakterien der Gattung *Salmonella* in Lebensmitteln auf der Grundlage des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Identifizierung von Salmonellen erfolgt in 24 Stunden; dadurch ergibt sich ein erheblicher Geschwindigkeitsvorteil gegenüber konventionellen Methoden, die für eine Identifizierung je nach taxonomischer Genauigkeit zwischen 5 und 14 Tagen benötigen.

2. Grundprinzip:

Salmonellen in Milch werden durch gegen rRNA-gerichtete fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden spezifisch erfaßt. Nach entsprechend stringenten Waschschritten werden die gebundenen Sonden wieder von ihren Zielstellen in den Bakterien abgelöst und in einem Fluorometer quantifiziert. Durch die Höhe des erhaltenen Signals im Fluorometer kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob in der Milch Salmonellen anwesend sind oder nicht.

3. Kurzbeschreibung:

Die Milchprobe, die auf die Anwesenheit von Salmonellen untersucht werden soll, wird mehrere Stunden inkubiert. Auf diese Weise wird sichergestellt, daß durch die Vermehrung der eventuell in der Milch vorhandenen Salmonellen erstens genügend Zielstellen für die Detektion mit Sonden vorhanden sind und zweitens nur lebende Salmonellen identifiziert werden. Ein Populationsshift durch die mehrstündige Inkubation ist unschädlich, da es nur um die Gegenwart oder Abwesenheit von Salmonellen' nicht jedoch um den Nachweis aller Bakterien geht. Nach der Zentrifugation und der Fixierung der Zellen, während der die Zellen für die Sonden zugänglich gemacht werden, können durch einen Lyseschritt die die anschließende Hybridisierung störenden Proteine ausreichend gut entfernt werden. Während der anschließenden Hybridisierung binden unter ausreichend stringenten Bedingungen die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden spezifisch an die rRNA oder Bakterien der Gattung *Salmonella*. Der anschließende Waschschritt sorgt für